

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0096641
Application Number

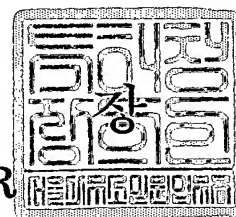
출원 년 월 일 : 2003년 12월 24일
Date of Application DEC 24, 2003

출원인 : 주식회사 삼양사
Applicant(s) SAMYANG CORPORATION



2004 년 12 월 14 일

특 허 청
COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0003
【제출일자】	2003. 12. 24
【발명의 명칭】	수용성 약물의 경구투여용 나노입자 조성물 및 그의 제조방법
【발명의 영문명칭】	A NANOPARTICLE COMPOSITION OF A WATER-SOLUBLE DRUG FOR ORAL ADMINISTRATION AND A PREPARATION METHOD THEREOF
【출원인】	
【명칭】	주식회사 삼양사
【출원인코드】	1-1998-001833-7
【대리인】	
【성명】	최규팔
【대리인코드】	9-1998-000563-8
【포괄위임등록번호】	2001-060594-6
【대리인】	
【성명】	이은선
【대리인코드】	9-1998-000423-1
【포괄위임등록번호】	2001-060595-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	배철민
【성명의 영문표기】	PAI, Chaul Min
【주민등록번호】	600805-1053119
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 110-104
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	민미홍
【성명의 영문표기】	MIN, Mi Hong
【주민등록번호】	690406-2243120
【우편번호】	305-761
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 (101-309동) 209-1306
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 황준석
 【성명의 영문표기】 HWANG, Jun Seok
 【주민등록번호】 690629-1029319
 【우편번호】 305-755
 【주소】 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 103-701
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조경미
 【성명의 영문표기】 CHO, Kyung Mi
 【주민등록번호】 771013-2392816
 【우편번호】 302-781
 【주소】 대전광역시 서구 만년동 상록수아파트 103-1503
 【국적】 KR

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
 최규팔 (인) 대리인
 이은선 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	20 면	20,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	0 항	0 원
【합계】		49,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 전하를 띤 수용성 약물과 이와 반대 전하를 띤 물질이 결합된 수용성 약물-반대전하물질 복합체 0.1 ~ 30 중량%, 지질 0.5 ~ 80 중량%, 폴리머 0.5 ~ 80 중량%, 유화제 1 ~ 80 중량%, 용해보조제 0 ~ 90 중량%를 포함하고, 상기 지질과 폴리머의 중량비가 1:0.05~3이며, 입자크기가 500 nm 이하인 나노입자를 함유하는 경구투여용 조성물 및 그의 제조방법에 관한 것으로서, 본조성물은 경구투여시 장관내 흡수율이 높고, 본 나노입자 조성물 내의 수용성 약물의 봉입율이 높으며, 지질 분해효소에 대해 안정하다.

【대표도】

도 3

【색인어】

수용성 약물, 경구투여, 나노입자 제형, 약물봉입율, 지질분해효소

【명세서】

【발명의 명칭】

수용성 약물의 경구투여용 나노입자 조성물 및 그의 제조방법{A NANOPARTICLE COMPOSITION OF A WATER-SOLUBLE DRUG FOR ORAL ADMINISTRATION AND A PREPARATION METHOD THEREOF}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 시험예 2에서 인슐린을 유효성분으로 하는 본 발명의 경구투여용 나노입자 조성물의 판크레아틴(단백질/지질분해효소)에 대한 안정성을 측정한 그래프이다. 도면 중 기호는 다음을 나타낸다.

-◆- ; 실시예 1

-■- ; 비교예 1

-▲- ; 비교예 2

-X- ; 비교예 3

-*- ; 비교예 4

도 2는 시험예3 (2)에서 인슐린을 유효성분으로 하는 본 발명의 경구투여용 나노입자 조성물을 제 1형 당뇨병의 소장내 투여한 후 상대적 혈당치를 측정한 그래프이다. 도면 중 기호는 다음을 나타낸다.

-◆- ; 비교군(인슐린 함유 pH 7.4 완충액, 인슐린 투여량 3 IU/kg)

-■- ; 실시예 1(인슐린 투여량 3 IU/kg)

도 3은 시험예3 (3) 1)에서 인슐린을 유효성분으로 하는 본 발명의 경구투여용 나노입자 조성물을 제 1형 당뇨병 쥐의 소장 내 투여한 후 상대적 혈당치를 측정한 그래프이다. 도면 중 기호는 다음을 나타낸다.

-◆- ; 비교군 1(인슐린 함유 pH 7.4 완충액, 인슐린 투여량 20 IU/kg)

-■- ; 실시예 1(인슐린 투여량 20 IU/kg)

-▲- ; 비교예 1(인슐린 투여량 20 IU/kg)

-X- ; 비교예 4(인슐린 투여량 20 IU/kg)

도 4는 시험예3 (3) 1)에서 인슐린을 유효성분으로 하는 본 발명의 경구투여용 나노입자 조성물을 제 1형 당뇨병 쥐의 소장내 투여한 후 상대적 혈당치를 측정한 그래프이다. 도면 중 기호는 다음을 나타낸다.

-◆- ; 실시예 1(인슐린 투여량 20 IU/kg)

-■- ; 비교군 2(인슐린 주사액, 피하주사, 인슐린 투여량 0.2 IU/kg)

도 5는 시험예 3(3) 2)에서 인슐린을 유효성분으로 하는 본 발명의 경구투여용 나노입자 조성물을 제 1형 당뇨병 쥐의 소장내 투여한 후 인슐린 농도를 측정한 그래프이다. 도면 중 기호는 다음을 나타낸다.

-◆- ; 대조군(인슐린 비함유 경구투여용 나노입자 제형)

-■- ; 실시예 1(인슐린 투여량 20 IU/kg)

-▲- ; 비교예 1(인슐린 투여량 20 IU/kg)

-X- ; 비교예 4(인슐린 투여량 20 IU/kg)

도 6은 시험예 3(3) 2)에서 인슐린을 유효성분으로 하는 본 발명의 경구투여용 나노입자 조성물을 제 1형 당뇨병의 소장내 투여한 후 인슐린 농도를 측정한 그래프이다. 도면 중 기호는 다음을 나타낸다.

-◆- ; 실시예 1(인슐린 투여량 20 IU/kg)

-■- ; 비교군(인슐린 주사액, 피하주사, 인슐린 투여량 0.2 IU/kg)

도 7은 시험예 4(1) 1)에서 세프트리악손을 유효성분으로 하는 본 발명의 경구투여용 나노입자 조성물을 정상쥐의 십이지장에 투여한 후 세프트리악손 농도를 측정한 그래프이다. 도면 중 기호는 다음을 나타낸다.

-◆- ; 실시예 6 (세프트리악손 투여량 40 mg/kg)

-■- ; 실시예 7 (세프트리악손 투여량 40mg/kg)

-▲- ; 비교예 5 (세프트리악손 투여량 40mg/kg)

-X- ; 비교군 1 (세프트리악손 함유 수용액, 세프트리악손 투여량 40 mg/kg)

도 8은 시험예 4(1) 1)에서 세프트리악손을 유효성분으로 하는 본 발명의 경구투여용 나노입자 조성물을 정상쥐의 십이지장에 투여한 후 세프트리악손 농도를 측정한 그래프이다. 도면 중 기호는 다음을 나타낸다.

-◆- ; 실시예 6 (세프트리악손 투여량 40 mg/kg)

-■- ; 실시예 7 (세프트리악손 투여량 40mg/kg)

-▲- ; 비교군 2 (세프트리악손 주사액, 정맥주사, 세프트리악손 투여량 20 mg/kg)

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <35> 본 발명은 장관내 흡수율을 높인 수용성 약물을 함유하는 경구 투여용 나노입자 조성물 및 그의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 수용성 약물을 반대전하 물질과 결합시킨 후 지질, 폴리머, 유화제를 첨가하여 나노입자를 제조함으로써 지질/폴리머로 구성된 나노입자 제형내 수용성 약물의 봉입율을 높이고, 지질 분해효소에 대해 안정한 경구투여용 나노입자 조성물 및 그의 제조방법에 대한 것이다.
- <36> 생리활성 물질인 단백질 약물을 포함한 수용성 약물은 위장관내에서 약물의 안정성이 낮고, 장관벽에 대해 투과성이 낮기 때문에 혈관 내에 주사하는 방법을 사용하였으나, 환자들이 일상생활을 하면서 주사하는 것이 불편함에 따라 수용성 약물을 경구제형으로 만들려는 노력이 있어 왔다.
- <37> 수용성 약물을 경구제형으로 제조시에 위장관내에서 수용성약물이 pH 및 소화효소에 의해 화학적으로 분해되어 약물의 안정성이 떨어질 경우 주입한 약물의 대부분 또는 일부분이 제 역할을 하지 못하게 됨으로써 경구투여시 약효가 제대로 발현되지 못하게 된다. 특히 pH 변화에 따라 약물의 용해성이 저하되거나 약물이 분해될 경우 위장관내에 존재하는 효소들에 의해 약물의 역가가 상실되고 투여약물의 생체이용율은 매우 낮게 된다. 이러한 장애요소를 없애기 위해서 수용성 약물을 외부 화학적인 환경, 즉 pH나 소화효소에 노출되지 않도록 생체막 친화성이 높은 지질이나 폴리머에 봉입시킨 제형 연구가 진행되어 왔다.

- <38> 선행기술로는 w/o 에멀전, w/o/w 에멀전, 리포솜을 이용한 수용성 약물의 경구흡수 제형이 있다. 그러나 이들 제제의 경우 수용성 약물의 제형 내 봉입이 충분치 않고 제형의 안정성이 낮다는 단점이 있다.
- <39> 미국특허 제 6,004,534호에는 백신이나 알레르겐에 대해 타겟팅된 리포솜을 사용하여 백신이나 알레르겐과 같은 수용성 약물을 특정조직으로 갈 수 있도록 하는 기술이 개시되어 있으나, 이 특허에 의하면 수용성 약물의 리포솜내 봉입율이 약 35%로 약물의 봉입율이 낮다는 문제점이 있다.
- <40> 미국특허 제 6,191,105호에는 인슐린 중합체를 w/o 마이크로에멀전 제형으로 제조하는 것을 개시하고 있으나, w/o 에멀전은 일반적으로 체내투여시 상전환에 의해 에멀전 구조가 파괴될 수 있기 때문에 수상에 용해된 약물이 유상에 의해 보호받지 못하고 체내에 노출된다는 문제점이 있다.
- <41> 미국특허 제 6,277,413호에는 수용성 약물이 내부 수상에 들어가도록 w/o/w 에멀전을 제조하는 방법이 기재되어 있으나, 이 방법은 에멀전의 입자크기가 10~20 마이크로미터로서 매우 크고, 제조시 내부 수상에 봉입되어 있던 수용성 약물이 외부 수상으로 방출될 가능성이 높아 수용성 약물의 봉입율이 낮다는 문제점이 있다.
- <42> 한국공개특허 제 2002-66776호에는 500nm 이하의 크기를 갖는 모노글리세라이드계 지질 전달체를 통해서 인슐린을 경구투여하는 제형이 개시되어 있다. 그러나 이 전달체는 지질로만 구성되어 있기 때문에 체내 지질분해효소에 의해 분해될 수 있다는 문제점이 있다.
- <43> Journal of controlled Release 69, p283-295(2000)에 의하면 인슐린을 함유한 PLGA 마이크로스피어는 약물봉입율이 50%미만이었으며 입자크기도 5 μ m 이상으로 제조되었다. 마이크로 크

기 입자의 경우 장관내로 흡수되지 못하고 장기의 상피세포 표면에서 주로 발견되지만, 100 나노 크기 입자의 경우 마이크로 크기 입자보다 15-250배 이상 장관으로 흡수된다고 보고(참조문헌 Pharm Res 13(12) p1838-1845(1996))되어 있어 5 μ m 크기의 PLGA 마이크로스피어는 인슐린의 봉입율도 낮을 뿐아니라 나노입자크기의 전달체보다 수용성 약물인 인슐린을 효과적으로 전달하지는 못한다.

<44> 또한, 미국특허 제 5962024호에 따르면 히드록시프로필메틸셀룰로오스 아세테이트 숙신산이나 메타크릴산 메틸 메타크릴레이트 공중합체와 같은 장용성 폴리머를 사용하여 과립을 제조하거나 과립코팅하여 pH 6.5 이상에서 약물을 용출시켰다. 이와 같이 장용성 폴리머만을 이용하여 마이크로스피어를 제조할 경우 장관내에서 폴리머가 용해됨으로 인해 마이크로스피어 내부에 봉입되어 있는 약물이 장관내에 노출됨으로써 위장관내에서 불안정한 약물을 안정하게 유지할 수 없다는 단점이 있다.

<45> 한편, 수용성 약물의 경우 지용성 전달체 또는 폴리머로 구성된 전달체와의 친화성 문제로 제조과정 중 전달체내에 봉입되는 분율이 낮다는 단점이 있기 때문에 수용성 약물의 전달체내 약물의 봉입율을 높이기 위해서는 수용성 약물의 전하를 제거하여 수용성을 낮추는 것이 필요하다.

<46> 국제 특허공개 제 94/08599호에는 인슐린을 소듐라우릴설페이트와 이온결합시킨 복합체를 만드는 기술이 개시되어 있는 바, 이 기술은 인슐린-소듐라우릴설페이트복합체를 단지 유기용매에 용해시킨 후 폐전달이나 좌제 등으로 사용하는 방법으로 경구투여시 약물이 그대로 위장관에 노출되기 때문에 약물을 안정하게 유지할 수 없다는 단점이 있다.

<47> 또한, 미국특허 제 5,858,410호에는 난용성 약물을 분쇄(milling) 및 마이크로플루다이저(microfluidizer)를 이용하여 나노입자화하는 방법이 개시되어 있으나 이 방법은 단백질, 약물이

나 생체 내에서 불안정한 수용성 약물에 적용할 경우 약물이 생체내 환경에 그대로 노출되기 때문에 적합하지 않은 단점이 있다.

<48> 이상에서 검토한 바와 같이 단백질 약물을 포함한 생체 내에서 불안정한 수용성 약물을 경구투여하기 위해서는 위장관의 지질분해효소에 대해 안정한 나노 입자를 설계하는 것과 약물 전달체에 높은 수율로 수용성 약물을 봉입시키는 것이 필요하다. 이를 달성하기 위해 다음과 같은 기술적 요소가 요구된다.

<49> 첫째, 나노 입자 제형이 위장관 내에서 분해되지 않고 봉입된 약물을 안정한 상태로 유지시키기 위해서는 지질 나노 입자의 생체내 안정성을 높이기 위해 적정량의 폴리머가 함유된 제형설계가 필요하다.

<50> 둘째, 수용성 약물을 수식하여 지용성 수송체와 친화성이 있도록 수용성 약물-반대전하물질 복합체를 제조한 후 이와 유사한 친화성을 갖는 지질/폴리머 시스템을 선택하여 수용성 약물의 지용성 수송체내에 봉입율을 높일 수 있는 제형설계가 필요하다.

<51> 셋째, 수용성 약물-반대전하물질 복합체를 함유한 지질/폴리머입자를 최소한의 크기로 나노입자화하는 제조방법이 요구된다. 또한 나노입자 내부에 약물이 봉입되어 있어 약물이 외부환경에 노출되지 않고 활성을 최대한 유지한 상태로 체내에 흡수되도록 나노입자 제조방법을 확립하여야 한다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<52> 본 발명자들은 상술한 바와 같은 문제점을 개선하고, 상기한 기술적 요건을 만족시키는 약물수송체를 개발하고자 각고의 연구 및 실험을 거듭한 결과, 수용성 약물-반대전하물질 복합체, 특정비의 지질 및 폴리머 등을 이용하여 입자크기가 500 나노미터 이하인 경구투여용 나노

입자 조성물을 제조하여 수용성 약물 봉입율을 높이고 폴리머 함유 생체내 분해효소에 대해 저항성을 높일 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

<53> 본발명의목적은수용성 약물-반대전하물질 복합체를 포함하여 약물봉입율이 높고, 지질분해효소에 대해 저항성이 있어 체내 경구흡수율을 높일 수 있는 경구투여용 나노 입자 조성물과 그 제조방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<54> 본 발명은 전하를 띤 수용성 약물과 이와 반대 전하를 띤 물질이 결합된 수용성 약물-반대전하물질 복합체 0.1 ~ 30 중량%, 지질 0.5 ~ 80 중량%, 폴리머 0.5 ~ 80 중량%, 유화제 1 ~ 80 중량%, 용해보조제 0 ~ 90 중량%를 포함하고, 상기 지질과 폴리머의 중량비가 1:0.05~3이며, 입자크기가 500 nm 이하인 나노입자를 함유하는 경구투여용 조성물을 제공한다. 상기 지질과 폴리머의 중량비는 바람직하게는 1:0.2~1이다.

<55> 또한, 본 발명은 (a) 전하를 띤 수용성 약물을 반대 전하를 띤 물질과 이온결합시켜 수용성 약물-반대전하물질 복합체를 형성하는 단계; (b) 얻어진 복합체에 지질, 폴리머 및 용해보조제를 넣어 용해시키는 단계; (c) (b)에서 얻은 혼합물을 유화제 함유 수용액에 가하여 균질한 액상을 얻는 단계; 및 (d) (c) 에서 얻은 혼합물로부터 용해보조제를 제거하는 단계 및 (e) 임의로 마이크로플루다이어(Microfluidizer)를 사용하여 입자 크기를 최소화하는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 경구투여용 나노입자 조성물의 제조방법을 제공한다.

<56> 또한, 본 발명은 (a) 전하를 띤 수용성 약물을 이와 반대 전하를 띤 물질과 이온결합시켜 수용성 약물-반대전하물질 복합체를 형성하는 단계; (b) 얻어진 복합체에 지질 및 용해보조제를 넣

어 용해시키는 단계; (c) (b)에서 얻은 혼합물을, 폴리머 및 유화제 함유 수용액에 가하여 균질한 액상을 얻는 단계; 및 (d) (c)에서 얻은 혼합물로부터 용해보조제를 제거하는 단계 및 (e) 임의로 마이크로플루다이어저(Microfluidizer)를 사용하여 입자 크기를 최소화하는 단계를 포함하는 본발명에 따른 경구투여용 나노입자 조성물의 제조방법을 제공한다.

<57> 이하에서는 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<58> 본 발명에 따른 경구투여용 나노입자 조성물은 전하를 띤 수용성 약물과 이와 반대 전하를 띤 물질이 결합된 수용성 약물-반대전하물질 복합체 0.1 ~ 30 중량%, 지질 0.5 ~ 80 중량%, 폴리머 0.5 ~ 80 중량%, 유화제 1 ~ 80 중량%, 용해보조제 0 ~ 90 중량%를 포함하고, 상기 지질과 폴리머의 중량비가 1:0.05~3이며, 입자크기가 500 nm 이하인 나노입자를 함유하는 경구투여용 조성물이다. 바람직하게는 지질과 폴리머의 중량비가 1:0.2~1이다.

<59> 상기 수용성 약물-반대전하물질 복합체는 전하를 띤 약물을 이와 반대 전하를 갖는 물질과 반응시켜 얻어진다. 유효성분으로 사용될 수 있는 수용성 약물로는 수용액 중 전하를 띤 물질로서 인슐린, 에리스로포이에틴, 칼시토닌, 성장호르몬, 인터페론, 소마토스타틴 등의 펩타이드/단백질 약물과, 헤파린 및 세파계 항생제, 소듐 알렌드로네이트, 소듐 에티드로네이트, 소듐 파미드로네이트 등의 수중에서 전하를 띤 수 있는 약물 중에서 선택하여 사용하는 것이 바람직하다.

<60> 양전하를 갖는 약물에 이온결합될 음이온성 물질로는 소듐 올레이트, 소듐 라우릴 설페이트, 소듐 카프로에이트, 소듐 라우레이트 등 C₈₋₁₈ 지방산의 소듐염 화합물과 담즙산의 소듐염, 소듐 알지네이트, 소듐 카르복시메틸셀룰로오스 중에서 선택된 것을 사용하는 것이 바람직하며, 음전하를 갖는 약물에 이온결합될 양이온성 물질로는 카르니틴 염류, 벤잘코

늄클로라이드, 세트리미드 등과 같은 4급 암모늄화합물 중에서 선택된 것을 사용하는 것이 바람직하다.

- <61> 수용성 약물-반대전하물질 복합체의 함유량은 전체 나노입자 조성물 중에 0.1~30 중량%가 바람직하다.
- <62> 수용성 약물이 반대이온과 복합체를 형성하면 수용성 약물의 자체 전하가 없어지거나 약화됨으로써 수용성 약물의 지용성 전달체와의 친화성을 높이게 된다. 이로 인해 수용성 약물을 지용성 전달체 내로 많이 봉입할 수 있게 된다. 하기 실험예 1의 표 2에 나타난 바와 같이 본 발명의 조성물은 높은 약물 봉입율을 나타낸다.
- <63> 수용성 약물-반대전하물질 복합체 중 수용성 약물과 이와 반대전하물질의 몰비는 수용성 약물의 이온수를 고려하여 정하며 바람직하게는 1 : 0.1~20의 몰비 중에서 선택하는 것이 좋으며 더욱 바람직하게는 1:3 ~10의 몰비 중에서 선택하는 것이 좋다.
- <64> 상기 지질은 바람직하게는 모노글리세라이드류, 디글리세라이드류, 프로필렌글리콜지방산에스테르류(propylene glycol ester of fatty acid : 카프릴올 등), 글리세롤지방산에스테르류(Glycerol ester of fatty acid: 젤루시어 등), 세토스테아릴 알코올 및 세틸알코올 등으로 이루어지는 지방알코올류 중에서 1종 이상 선택되고, 전체 나노입자 조성물 중에서 그 함유량은 0.5~80 중량%가 바람직하고 보다 바람직하게는 0.5~30중량%이다
- <65> 상기 폴리머는 바람직하게는 메타크릴산 코폴리머, 히드록시프로필메틸셀룰로오스프탈레이트, 히드록시프로필메틸셀룰로오스아세테이트 석시네이트, 셀룰로오스아세테이트프탈레이트 등의 장용성 고분자, 셀락, 키토산, 히드록시프로필메틸셀룰로오스 및 그 유도체, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 소듐 알지네이트 및 카보머 중에서 1종 이상 선택되고 전

체 나노 입자 조성물 중에서 그 함유량은 0.5~80 중량%이고 바람직하게는 0.1~30 중량%를 사용하는 것이 좋다.

- <66> 상기 폴리머는 물에 불용성이거나 물에 용해되었을 때 점성이 높은 생분해성 고분자로서 지질 나노입자 제형에 첨가하였을 때 폴리머의 분해속도 지연으로 인해 나노입자 제형내에 삽입되어 있는 수용성 약물의 용출을 조절할 수 있다. 또한 폴리머는 지질 나노입자의 표면을 둘러싸거나 지질분자 사이에 삽입되어 지질 나노입자 제형의 효소에 대한 저항성을 제공할 수 있다. 즉 폴리머가 첨가됨으로써 지질분해효소에 의해 나노입자의 구조물인 지질의 분해를 막을 수 있어 나노입자 골격이 그대로 유지됨으로써 나노입자 내부에 봉입되어 있는 수용성 약물의 화학적 안정성을 더욱 향상시킬 수 있다.
- <67> 폴리머를 지질 나노입자 제형에 첨가할 경우 폴리머의 함유량에 따라 지질 나노입자의 크기를 변화시킬 수 있으며 지질 대비 폴리머의 비율을 적절히 조절하여야 500 nm이하의 나노입자 제형을 완성할 수 있다.
- <68> 상기 유화제는 바람직하게는 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 공중합체(상품명: Poloxamer™, 폴리에틸렌 글리콜 알킬에테르(상품명: Brij™, 폴리옥시에틸렌 캐스터오일(상품명: Tween™, 폴리옥시에틸렌솔비탄지방산에스테르(상품명: Span™, 라브라필(Labrafil™, 라브라솔(Labrasol™, 플루롤올레이크(Plurol oleique™, 비타민 E 폴리에틸렌 글리콜 석시네이트(Vitamin E polyethylene glycol succinate), 레시틴, 소듐 라우릴 설페이트 및 담즙산 및 그 유도체 중에서 1종 이상 선택되고 전체 나노입자 조성물 중에서 그 함유량은 1~80 중량%가 바람직하다. 보다 바람직하게는 상기 유화제로 30~80 중량%를 사용하는 것이 좋다. 유화제는 제조된 지질/폴리머 나노입자가 수용액 중에 분산될 때 분산체를 안정화시키는 작용을 한다.

- <69> 상기 용해보조제는 바람직하게는 C₁₋₈알코올, 디메틸설폭사이드, 디클로로메탄, 톨루엔, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 및 12-히드록시 스테아레이트(상품명: Solutol™ 중에서 1종 이상 선택되고 전체 나노입자 조성물 중에서 그 함유량은 0~50 중량%가 바람직하다.
- <70> 또한 용해보조제 단독으로 수용성 약물-반대전하 물질 복합체, 폴리머 및 지질 등을 용해/분산시키지 못할 경우 상기에서 서술한 유화제 등을 첨가하여 균질한 액을 제조할 수 있다.
- <71> 또한 상기 조성물에는 통상적으로 사용되는 경구흡수개선제를 0~20 중량% 함유시킬 수 있으며, 상기 경구흡수 개선제에는 p-글라이코프로테인 억제제(p-glycoprotein inhibitor), 카르니틴 염류, 킬레이트화제 등에서 선택하여 사용하는 것이 바람직하다.
- <72> 또한 본조성물은 0.1 ~ 30 중량%의 동결건조 보호제와 함께 동결건조하는 것이 바람직하고, 분말로 제조한 후 일반 경구용 제형인 캡셀이나 정제 등을 제조할 수 있다. 상기 동결건조 보호제로는 글루코오즈, 만니톨, 소르비톨, 트리할로오즈와 같은 당류나 아르기닌 같은 아미노산류, 알부민 등의 단백질을 사용하는 것이 바람직하다.
- <73> 본 발명의 경구투여용 나노입자 조성물은 (a) 전하를 띤 수용성 약물을 이와 반대 전하를 띤 물질과 이온결합시켜 수용성 약물-반대전하물질 복합체를 형성하는 단계; (b) 얻어진 복합체에 지질, 폴리머 및 용해보조제를 넣어 용해시키는 단계; (c) (b)에서 얻은 혼합물을 유화제 함유 수용액에 가하여 균질한 액상을 얻는 단계; 및 (d) (c) 에서 얻은 혼합물로부터 용해보조제를 제거하는 단계 및 (e) 임의로 마이크로플루다이어(Microfluidizer)를 사용하여 입자 크기를 최소화하는 단계를 포함하는 방법에 따라 제조된다.

- <74> 상기 (a) 단계에서 수용성 약물-반대전하물질 복합체는 약물을 물 또는 적절한 완충액에 용해시켜 약물수용액을 만든 다음 약물과 반대전하를 갖는 물질을 상기 약물수용액과 반응시켜 제조한다.
- <75> 상기 수용성 약물과 반대전하물질 간의 최적비율은 1:0.1~20 비율 이내에서 약물의 이온 수를 고려하여 정하며, 이는 상기 반응에서 미반응된 약물을 분석하여 확정한다. 이렇게 제조된 수용성 약물-반대전하물질 복합체는 물로 3회 이상 세척하여 미반응된 약물을 제거한 후 사용하는 것이 바람직하다.
- <76> 특히 단백질 약물을 유효성분으로 하여 약물과 반대전하물질복합체를 제조하는 경우에는 단백질 약물에 전하를 부여하기 위해 pH 조절제를 사용할 수 있다. pH 조절제로는 염산, 인산, 탄산, 구연산 등의 산성화제 또는 수산화 나트륨, 인산일수소나트륨/칼륨, 인산이수소나트륨/칼륨, 인산나트륨, 구연산 나트륨 등의 알칼리화제 혹은 이들의 혼합액으로 구성된 완충액을 pH 조절제로 선택하여 사용할 수 있으며 약물량의 0.1 ~ 10배가 사용될 수 있다.
- <77> 상기 (b)~(d)단계에서 수용성 약물-반대전하물질 복합체와 지질을 용해보조제에 용해시킨 다음 폴리머를 함유한 수용액에 넣어서 교반한 후 용해보조제를 제거한다. 이 단계에서 폴리머의 용해성을 높이기 위해 산, 알칼리 및 보조유화제를 0.5~50 중량% 첨가할 수 있으며 용해도를 높이기 위해 가온할 수 있고 가온 온도는 30~70℃가 바람직하다.
- <78> 상기 (d)단계에서 휘발성이 강한 용해보조제를 제거하기 위해서는 질소가스를 주입하거나 진공 증발건조기(Vacuum evaporator) 등을 사용할 수 있으며, 휘발성이 낮은 경우 투석 등을 이용하여 용해보조제를 제거할 수 있다.

- <79> 상기 (e)단계에서는 마이크로플루다이저(Microfluidizer)를 사용하여 100MPa에서 3~10회 순환시키는 것이 바람직하다. 필요시 온도를 높여 나노입자의 크기를 더욱 줄일 수 있다. 가온 온도는 30~70℃가 바람직하다.
- <80> 본 발명의 경구투여용 조성물을 제조하는 또다른 방법은 (a) 전하를 띤 수용성 약물을 이와 반대 전하를 띤 물질과 이온결합시켜 수용성 약물-반대전하물질 복합체를 형성하는 단계; (b) 얻어진 복합체에 지질 및 용해보조제를 넣어 용해시키는 단계; (c) (b)에서 얻은 혼합물을, 폴리머 및 유화제가 함유된 수용액에 가하여 균질한 액상을 얻는 단계; 및 (d) (c)에서 얻은 혼합물로부터 용해보조제를 제거하는 단계 및 (e) 임의로 마이크로플루다이저(Microfluidizer)를 사용하여 입자 크기를 최소화하는 단계를 포함한다.
- <81> 이렇게 제조된 나노입자 조성물은 액상으로서 필요에 따라 동결건조 보호제를 첨가하여 동결건조시켜 분말화시킬 수 있다. 상기 동결건조 보호제는 동결건조시 제형 내 성분의 변성을 방지하기 위하여 사용한다. 동결건조 보호제는 바람직하게는 나노입자 조성물에 대해 0.1 ~ 30 중량%의 양으로 사용된다. 상기 동결건조 보호제로는 락토오스, 만니톨, 트리할로오스 등의 당류, 아르기닌 등의 아미노산류, 알부민 등의 단백질류를 사용하는 것이 바람직하다.
- <82> 이와 같은 방법으로 제조된 본 발명의 액상 및 분말제형은 손으로 흔들어 주는 등의 최소한의 물리적 혼합에 의해 쉽게 물에 분산시킬 수 있으며, 분산계를 형성하는 입자의 크기는 유화제나 약물의 성질에 따라 500nm 이하로 형성되어 종래 경구제형에 비해 매우 작은 크기를 형성할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 경구투여용 나노입자 제형의 입자의 크기가 20~300nm 인 것이 좋다.
- <83> 본 발명에 의한 나노입자 분말 조성물은 상온 이하에서 밀봉하여 장기간 동안 안정하게 보관할 수 있으며 사용하기 전에 물을 가해 분산액으로 제조할 수 있다.

<84> 또한, 본 발명의 나노입자 조성물은 다른 흡수개선제를 첨가하여 액제, 현탁제, 캡셀제 및 정제 등으로 개발될 수 있으며 고형제제의 경우, 장용코팅 등 일반적인 제형설계 등을 통하여 경구 생체이용율을 더욱 높일 수 있다.

<85> 이하 본 발명을 다음의 실시예에 의거하여 더욱 상세하게 설명하였는바, 본 발명이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<86> 실시예 1: 인슐린 함유 경구투여용 나노입자 조성물의 제조

<87> (1) 인슐린-반대전하물질 복합체의 제조

<88> 인슐린(Sigma사) 50mg을 pH 3 구연산완충액 20mL에 용해시키고, 소듐 도큐제이트(Aldrich사)를 인슐린 1에 대해 1:3, 1:6, 1:9 몰비율로 pH 3 구연산완충액 80mL에 녹인 후 반응시켜 인슐린-반대전하물질 복합체를 제조하였다. 반응 후 상등액 중의 인슐린을 미국약전에 기재되어 있는 인슐린 분석법에 따라 분석하여 표1과 같은 결과를 얻었다.

<89> <표1. 인슐린-반대전하물질복합체의 반응비>

인슐린 : 소듐 도큐제이트 몰비	상등액 중 미반응 인슐린
1:3	20.7%
1:6	0%
1:9	0%

<91> 상기 표1에서 알 수 있는 바와 같이, 인슐린과 소듐 도큐제이트의 몰비가 1:6이상이 될 경우 인슐린의 대부분이 인슐린-반대전하물질 복합체를 형성하였다. 따라서, 1:6 몰비로 제조한 인슐린-반대전하물질복합체를 pH 3 구연산완충액 및 물로 각각 3회 세척하여 다음 단계에 사용하였다.

<92> (2) 인슐린 함유 경구투여용 나노입자 제형의 제조

<93> 인슐린-소듐 도큐제이트 복합체 15mg, 모노올레인(TCI) 60mg을 에탄올 10mL에 녹인 후, 키토산(한국키토산) 20mg과 폴록사머 407™(BASF사) 200mg이 함유된 수용액 20mL에 넣어 균질한 액이 되도록 교반한 후 질소가스를 주입하여 에탄올을 제거하였다. 첨가제로서 키토산의 용해성을 높이기 위해 구연산을 1% 넣었다. 상기 지질/폴리머 나노입자를 마이크로플루다이저(EmulsiFlex-C5™, Avestin사)를 사용하여 상온, 100MPa에서 10회 순환시켜 인슐린 함유 경구투여용 나노 입자 제형을 제조하였다.

<94> (3) 입자 크기와 분포도 측정

<95> 제형의 입자크기 및 분산도는 만들어진 액상제형 200 μ l를 증류수 1mL에 분산시킨 후 광자분광법(ELS-8000™, Otsuka electronics사)으로 측정하였다. 그 결과 실시예 1의 액상 제형의 평균 입자경은 83.0nm이고 분산도는 0.300이었다.

<96> 비교예1

<97> 인슐린-반대전하물질 복합체 대신 인슐린을 사용하고 폴리머를 사용하지 않으며 마이크로플루다이저를 사용하지 않는 것을 제외하고 다른 조건은 실시예 1과 동일하게 하여 액상제형을 제조하였다. 실시예 1의 방법으로 입자크기와 분포도 측정방법을 사용하여 입자크기와 분포도를 측정한 결과 평균 입자경은 117.4nm, 분산도는 0.251이었다.

<98> 비교예2

<99> 인슐린-반대전하물질 복합체 대신 인슐린을 사용하고 마이크로플루다이저를 사용하지 않는 것을 제외하고 다른 조건은 실시예 1과 동일하게 하여 액상제형을 제조하였다. 실시예 1의 방법으로 입자크기와 분포도를 측정한 결과 평균 입자경은 241.8nm, 분산도는 0.090이었다.

<100> 비교예3

<101> 실시예 1의 방법으로 제조된 인슐린-반대전하물질 복합체 15mg와 모노올레인 60mg을 50℃에서 1시간 동안 초음파 분쇄한 후 키토산 20mg과 폴록사머407TM이 200mg이 함유된 1% 구연산 수용액 20mL에 넣어 다시 30분 동안 초음파 분쇄하였다. 이 후 마이크로플루다이저를 사용하여 상온, 100MPa에서 10회 순환시켜 인슐린 복합체 함유 액상제형을 제조하였다. 실시예 1의 방법으로 입자크기와 분포도를 측정한 결과 평균 입자경은 211.6nm, 분산도는 0.213 이었다

<102> 비교예4

<103> 마이크로플루다이저를 사용하지 않는 것을 제외하고 다른 조건은 실시예 1과 동일하게 하여 액상제형을 제조하였다. 실시예 1의 방법으로 입자크기와 분포도를 측정한 결과 평균 입자경은 234.3nm, 분산도는 0.291이었다.

<104> 실시예 2: 인슐린 함유 경구투여용 나노입자 분말제형의 제조

<105> 실시예 1에서 제조한 경구투여용 나노입자의 액상제형을 고형화하는 과정에서 나노입자의 크기 증가를 최소화 하기위해 경구투여용 나노입자의 액상제형에 만니톨을 5% 가한 후 서로 다른 동결건조 조건에서 고형화한 후 물에 분산시켜 입자크기를 측정하여 다음의 표 2에 나타내었다

<106> <표2>

<107>

동결건조 조건		동결건조전 (nm)	동결건조후 (nm)	동결건조 전/후 입자 크기 증가비
조건 I	실온, 48시간	68.1	339.8	5.0
조건 II	0℃:12시간→0℃:8시간→5℃24시간	82.5	188.5	2.3
조건 III	-25℃:24시간→0℃:24시간	118.1	196.4	1.7

<108> 상기 표2를 통해서 알 수 있듯이, 측정 결과 입자크기 변화를 최소화하기 위해서는 영하의 조건에서 동결건조하는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

<109> 경구투여용 나노입자의 액상제형에 만니톨을 0.5%, 1%, 2%, 4%, 5% 가한 후 영하 25℃, 6시간, 연속하여 영상 20℃, 6시간 조건에서 고형화하고 물에 분산시킨 후 실시예 1의 방법을 사용하여 입자크기를 측정하여 표 3에 나타내었다.

<110>

만니톨	-25℃, 6시간→20℃, 6시간	
	입자크기	동결건조전/후 입자크기 증가비
0.5%	394.1nm	3.4
1%	335.1nm	2.8
2%	321.6nm	2.7
4%	217.3nm	1.8
5%	196.4nm	1.7

<111> 측정 결과 동결건조 보호제의 농도가 약 5%일 때 입자크기의 변화가 가장 작음을 알 수 있었다.

<112> 실시예 3: 인슐린 함유 경구투여용 나노입자 제형의 제조 2

<113> 실시예 1에서 소듐 도큐제이트 대신 소듐 라우릴설페이트(Sigma사)를 1:7비로 사용하여 인슐린-반대전하물질 복합체를 제조한 후 인슐린-반대전하물질 복합체, 모노올레인, 폴리에틸렌 글리콜 2000을 각각 15mg, 45mg, 90mg 달아 에탄올 10mL에 녹인 후, 이하 동일하게 처리하여 인슐린 함유 경구투여용 나노입자 조성물을 제조하였다.

<114> 실시예 1의 방법을 사용하여 입자크기를 측정한 결과 평균 입자경은 121 nm, 분산도는 0.314이었다

<115> 실시예 4: 인슐린 함유 경구투여용 나노입자 조성물의 제조 3

<116> 모노올레인 대신 라브라팍™(Gattefosse사)을 사용하는 것을 제외하고 이하 실시예 1과 동일하게 하여 인슐린 함유 경구투여용 나노입자 조성물을 제조하였다. 실시예 1의 방법을 사용하여 입자크기를 측정한 결과 평균 입자경은 129.4nm, 분산도는 0.227이었다

<117> 실시예 5: 인슐린 함유 경구투여용 나노입자 조성물의 제조 4

<118> 키토산 대신 유드라진L™(Rohm사)과 유드라진S™(Rohm사) 1:1 혼합물 60mg을 에탄올에 넣어 제조하는 것을 제외하고 이하 실시예 1과 동일하게 하여 인슐린 함유 경구용 나노입자 조성물을 제조하였다. 실시예 1의 방법을 사용하여 입자크기를 측정한 결과 평균 입자경은 194.2 nm, 분산도는 0.128이었다.

<119> 비교예 5

<120> 모노올레인을 사용하지 않고 마이크로프루다이지를 사용하지 않은 것을 제외하고 다른 조건은 실시예 5와 동일하게 하여 액상제형을 제조하였다. 실시예 1의 방법을 사용하여 입자크기를 측정한 결과 평균 입자경은 350.9nm, 분산도는 0.009이었다.

<121> 실시예 6: 세프트리악손을 함유한 경구투여용 나노입자 제형의 제조

<122> (1) 세프트리악손-반대전하물질 복합체의 제조

<123> 세프트리악손(하원 정밀화학) 100mg을 증류수 20mL에 용해시키고, 벤잘코늄클로라이드(Sigma사)를 세프트리악손 대비 1:2 몰비율로 달아 증류수에 녹인 후 4℃에서 반응시켰다. 상등액을 취하여 세프트리악손을 미국약전에 기재된 세프트리악손 분석법에 따라 분석한 결과, 99.9%의 세프트리악손이 세프트리악손-반대전하물질 복합체로 존재함을 알 수 있었다.

<124> (2) 세프트리악손 함유 경구용 액상제형의 제조

<125> 세프트리악손-반대전하물질 복합체 120mg, 모노올레인 60mg, 유드라지트TML과 유드라지트TMS의 1:1 혼합물 30mg을 에탄올 15mL에 녹이고, 라브라솔TM(Gattefosse) 375mg, 폴록사머 407TM 300mg이 함유된 수용액 30mL에 넣어 균질한 액이 되도록 교반한 후 이하 실시예 1과 동일하게 처리하여 세프트리악손 함유 경구투여용 나노입자 제형을 제조하였다. 실시예 1의 방법을 사용하여 입자크기를 측정한 결과 평균 입자경은 199.0nm 분산도는 0.135이었다.

<126> 비교예 6

<127> 세프트리악손-반대전하물질 복합체 대신 세프트리악손을 사용하고, 폴리머를 사용하지 않고 마이크로플루다이지를 사용하지 않는 것을 제외하고 다른 조건은 실시예 6과 동일하게 하여 액상제형을 제조하였다. 실시예 1의 방법으로 입자크기와 분포도 측정방법을 사용하여 입자크기와 분포도를 측정한 결과 평균 입자경은 149.4nm 분산도는 0.124이었다.

<128> 실시예 7: 세프트리악손을 함유한 경구투여용 나노입자 제형의 제조

<129> 세프트리악손-반대전하물질 복합체 240mg, 카프릴TM(Gattefosse사) 1200mg을 에탄올 15mL에 녹이고, 라브라솔TM 240mg, 키토산 30mg, 폴록사머407TM 300mg이 함유된 수용액 30mL에 넣어

교반한 후 이하 실시예 1과 동일하게 처리하여 세프트리악손 함유 경구투여용 나노입자 제형을 제조하였다. 첨가제로서 키토산의 용해성을 높이기 위해 구연산을 300mg을 넣었다. 실시예 1의 방법을 사용하여 입자크기를 측정한 결과 평균 입자경은 290.1nm 분산도는 0.197이었다.

<130> 시험예 1. 약물 봉입효율 측정

<131> 상기 실시예 1 내지 실시예 7과 비교예 1 내지 비교예 6에서 제조한 액상제형 500uL를 증류수 500uL에 분산시킨 후 밀리포어사의 센트리콘 YM-30™(분획분자량: 30,000)에 넣고 상대원심력 1500g에서 60분간 원심분리하였다. 상기에서 분리된 여과액 중 약물을 분석하여 나노입자 중 약물의 봉입효율을 환산하여 표 4에 나타내었다.

<132> < 표 4. 경구투여용 나노 입자 제형 중 약물봉입율 >

<133>

	약물 봉입율
실시예1	99.8%
실시예2	98.7%
실시예3	97.2%
실시예4	90.3%
실시예5	91.3%
실시예6	90.5%
실시예7	92.0%
비교예1	72.4%
비교예2	64.8%
비교예3	70.7%
비교예4	95.7%
비교예5	92.6%
비교예6	40.8%

<134> 시험예 2. 효소에 의한 분해성 평가 - 단백질/지질 분해효소인 판크레아틴에 의한 분해

<135> 체내에는 지질분해효소가 존재하기 때문에 지질로 구성된 나노입자가 지질분해효소에 안정하여
 야만 지질 나노 입자 내에 봉입된 인슐린이 외부로 노출되지 않아 단백질 분해 효소에 의해 분해

되지 않을 수 있다. 따라서 본 발명의 실시예를 비교예와 함께 단백질/지질 분해능이 있는 생체내 효소인 판크레아틴에 대한 효소 안정성 여부를 확인하였다.

<136> 상기 실시예 1 내지 실시예 5와 비교예1 내지 비교예 4에서 제조한 액상제형 5mL를 판크레아틴(USP 등급) 0.0067% pH 7.4 완충액 15mL에 넣고 37℃에서 0, 1, 3, 5시간 반응시킨 후 시험액에 남아있는 인슐린을 측정하여 표 5에 나타내었다.

<137> < 표 5. 인슐린 함유 경구투여용 나노입자 제형의 판크레아틴에 대한 안정성>

<138>

시간 항목	잔류 인슐린 양(%)			
	시험개시	1시간 후	3시간 후	5시간 후
실시예1	100.0 %	95.8%	93.6%	91.6%
실시예3	100.0 %	100.0%	97.5%	93.5%
실시예4	100.0 %	99.1%	96.8%	93.4%
실시예5	100.0 %	92.7%	92.0%	91.3%
비교예1	100.0 %	9.1%	0.8%	0%
비교예2	100.0 %	87.5%	82.6%	82.1%
비교예3	100.0 %	91.6%	69.2%	57.2%
비교예4	100.0 %	100.0%	97.5%	93.5%
비교예5	100.0%	51.2%	14.9%	14.5%

<139> 상기 표 4와 표 5에서 나타난 것처럼 인슐린-반대전하물질 복합체 및 지질/폴리머를 함유한 실시예 1 내지 실시예 5의 경우 약물 봉입율도 높고 효소안정성도 매우 높았다. 그러나 지질만을 함유한 비교예 1이나 폴리머만을 함유한 비교예 5의 경우 효소안정성이 매우 떨어져서 판크레아틴에 대한 인슐린의 5시간째 안정성이 20% 미만이었다.

- <140> 특히 인슐린-반대전하물질 복합체가 아닌 인슐린으로 제조한 나노입자의 경우 비교예 1과 비교예 2에서 보는 바와 같이 약물 봉입율이 낮았다. 폴리머가 함유된 비교예 2의 경우 표 5에서 나타낸 것처럼 폴리머가 함유되지 않은 비교예 1보다 효소안정성이 우수하였다.
- <141> 나노입자 제형의 제조방법 중 마이크로플루다이저 방법만을 사용한 비교예 3의 경우, 에탄올 같은 용해보조제를 사용하여 1차로 나노입자 제형을 제조한 후 마이크로플루다이저 방법을 사용한 실시예 1보다 인슐린-반대전하물질 복합체의 봉입율도 낮았고 효소안정성도 떨어졌다. 마이크로플루다이저 방법을 거치지 않고 용해보조제를 사용하여 나노입자 제형을 제조한 비교예 4의 경우 실시예 1과 같이 약물봉입율 및 효소안정성이 우수함을 알았다.
- <142> 이상에서 보는 바와 같이 인슐린-반대전하물질 복합체를 사용하지 않고 인슐린을 사용한 경우 나노입자 제형내 약물봉입율이 낮았으며 나노입자 제형이 지질 및 폴리머로 이루어질 경우 효소안정성이 우수함을 알았다. 또한 약물봉입율 및 효소안정성이 우수한 나노입자 제형을 얻기 위해서는 단순히 마이크로플루다이저법만을 사용하는 것이 아니라 용해보조제를 사용하여 1차적으로 나노제형을 제조하는 공정이 필요하다는 사실을 확인하였다.
- <143> 상기 결과를 종합하여 볼 때, 본 발명과 같이 약물-반대전하물질 복합체를 형성한 다음 이를 지질과 폴리머가 함유된 수송체에 봉입하여 제조한 나노입자가 약물봉입율이 우수함은 물론 단백질/지질 분해효소에 대한 안정성이 우수함을 알 수 있었다.
- <144> 시험예 3. 동물 유효성 평가1
- <145> 상기 실시예 1에서 제조한 경구투여용 나노입자 액상제형을 가지고 동물실험을 수행하였다.
- <146> (1) 당뇨 유도

- <147> 약 180~220g의 수컷 정상쥐(Sprague Dawley)에 스트렙토조토신(Sigma) 45mg/kg를 이틀 간격으로 2회 복강주사하여 제 1형 당뇨병을 제조하였다. 상기와 같이 처리된 쥐를 일주일 경과 후 12시간 절식시킨 다음 혈액을 채혈하여 혈당을 측정한 결과 혈당값이 300mg/dL이상인 쥐를 제 1형 당뇨병으로 간주하여 이후의 실험을 진행하였다. 혈당은 로슈사의 글루코트랜드2™를 이용하여 측정하였다.
- <148> (2) 경구투여용 나노입자 액상제형 내의 인슐린의 생리활성 보존 여부 실험
- <149> 실시예 1의 나노입자 액상제형 2mL을 생리식염수 2mL에 분산시킨 후 3 IU/kg의 인슐린 농도로 제 1형 당뇨병에 근육주사하였다.
- <150> 비교군으로 인슐린을 pH 7.4 완충액에 희석시킨 액을 3 IU/kg의 인슐린 농도로 제 1형 당뇨병에 근육주사하였다. 일정시간 간격으로 혈액을 꼬리정맥으로부터 뽑아 혈당을 측정하였다.
- <151> 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 경구투여용 나노입자 액상제형과 인슐린용액의 생리활성을 비교해 본 결과 본 발명의 나노입자 액상제형에 인슐린의 생리활성이 그대로 보존되어 있음을 확인하였으므로 본 발명의 액상제형을 가지고 하기의 동물실험을 실시하였다.
- <152> (3) 경구투여용 나노입자 액상제형의 위장관내 흡수실험
- <153> 1) 혈당 측정
- <154> 제 1형 당뇨병을 에테르 마취시키고 배를 개복한 후 소장을 꺼내어 맹장 상단부위 5cm 위에 인슐린이 포함된 액상제형을 20 IU/kg의 농도로 투여하였다. 이후 수술부위를 꿰매어 당뇨병이 자유롭게 움직이고 물을 마시게 하였다.
- <155> 시험군으로는 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 4를 가지고 실험하였다. 비교예 1은 실시예 1과 비교하였을 때 인슐린-반대전하물질 복합체를 사용하지 않았으며 폴리머를 함유하지 않아 약물

봉입율도 낮고 효소안정성도 매우 낮은 나노입자 제형이며, 비교예 4는 약물봉입율 및 효소안정성도 우수하나 마이크로플루다이저 방법을 사용하지 않아 실시예 1보다 나노입자 제형의 크기가 비교적 큰 나노입자 제형이다. 비교군 1로는 인슐린을 함유한 pH 7.4 인산완충액을 20 IU/kg의 용량으로 실시예 1과 동일한 경로로 투여하였고, 비교군 2로는 인슐린 주사액을 0.2IU/kg의 용량으로 피하주사하였다.

<156> 약물투여 후 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7시간째에 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 투여 전 초기값을 100%로 하여 각 시간대의 혈당값을 환산하였다.

<157> 도 3에서 나타난 바와 같이, 실시예 1을 투여하였을 때 초기에 비해 약 73%의 혈당값이 저하된 반면, 비교예 1의 경우 거의 혈당강하가 나타나지 않았다. 또한 시간에 따른 혈당감소 면적을 비교하여 보았을 때 마이크로플루다이저를 통과하지 않은 비교예 4는 실시예 1의 약 70%에 지나지 않았다.

<158> 이상의 결과로 볼 때 인슐린-반대전하물질 복합체가 아닌 인슐린을 지질수송체에만 봉입시킨 나노제형의 경우 In vivo에서 혈당강하 효과가 거의 없는 것으로 판단되었다. 또한 지질 나노입자 제형 제조시 마이크로플루다이저를 통과시켜 입자크기를 감소시켰을 때 혈당을 낮추는 효과가 약 40% 증대됨을 알았다.

<159> 도 4에서 나타난 바와 같이, 실시예 1을 투여하였을 경우 인슐린 0.2 IU/kg을 피하주사한 것과 매우 유사한 혈당강하작용을 나타내었다.

<160> 2) 혈중 인슐린 농도 측정

<161> 상기 혈당 측정방법과 동일하게 실험하였다.

- <162> 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 4를 가지고 실험하였으며, 대조군으로는 인슐린을 함유하지 않은 경구투여용 나노 입자 액상 제형을 실시예 1과 동일한 경로로 투여하였고, 비교군으로는 인슐린 주사액을 0.2 IU/kg의 용량으로 피하주사하였다.
- <163> 약물투여후 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5시간째에 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈중 인슐린농도를 측정하였다. 혈중 인슐린농도는 인슐린 분석 키트(Coat-a-count™, Diagnostic Products Corporation사)를 사용하여 측정하였다.
- <164> 도 5에서 나타난 바와 같이, 인슐린을 함유하지 않은 대조군의 경우 혈중 인슐린 농도가 20 uIU/mL이하인데 반해서 실시예 1의 경우 최고 혈중농도가 약 170 uIU/mL로서 높은 인슐린 흡수율을 나타내었다. 인슐린-반대전하물질 복합체가 아닌 인슐린을 지질수송체에만 봉입시킨 비교예 1의 경우 최고 혈중농도 시간에서 약 15 uIU/mL의 인슐린만이 흡수되었다. 또한 마이크로플루다이저를 통과하지 않은 비교예 4의 경우 최고 혈중농도 시간에서 약 70 uIU/mL의 인슐린이 흡수되었다. 또한 초기 인슐린농도 대비 시간에 따른 인슐린의 증가 면적(AUC)을 비교하여 보았을 때, 실시예 1은 비교예 4보다 약 140% 증가하였다. 이는 시간에 따른 혈당 감소 면적을 비교한 것과 유사한 값이다.
- <165> 제 1 형 당뇨쥐에 인슐린 흡수율을 높이기 위해서는 인슐린-반대전하물질 복합체를 폴리머 함유 지질수송체에 봉입시키는 것이 우수한 결과를 나타냄을 알 수 있었고, 지질 나노 입자 제형 제조시 고압균질기를 통과시키는 방법을 병행하여 입자 크기를 감소시키는 것이 더 유효함을 알 수 있었다.
- <166> 도 6에서 나타난 바와 같이, 실시예 1을 투여하였을 경우 초기 당뇨환자에게 사용하는 인슐린 용량인 0.2 IU/kg를 피하주사한 것과 유사한 혈중 인슐린 농도 프로파일을 나타내었다.

<167> 시험예4 동물 유효성 평가2

<168> 상기 실시예 6 및 실시예 7과 비교예 6에서 제조한 세프트리악손 함유 경구투여용 나노 입자 액상 제형을 가지고 동물실험을 수행하였다.

<169> (1) 경구투여용 나노입자 액상제형의 위장관내 흡수실험

<170> 1) 혈당 측정

<171> 정상쥐(Sprague Dawley, 수컷, 200g 내외)를 에테르 마취시키고 배를 개복한 후 십이지장을 꺼내어 세프트리악손이 함유된 나노입자 액상제형을 세프트리악손으로서 40mg/kg 용량으로 투여하였다.

<172> 시험군으로는 실시예 6과 실시예 7 및 비교예 6를 가지고 실험하였다. 비교예 6의 경우는 실시예 6과 비교하였을 때 세프트리악손-반대전하물질 복합체를 사용하지 않고, 폴리머를 함유하지 않아 약물 봉입율도 낮고 약물의 용출율도 제어되지 않는 제형이다.

<173> 약물투여 후 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4시간째에 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 미국약전에 수재된 세프트리악손 분석법에 따라 분석하였다. 혈액은 3000rpm에서 10분 원심분리한 후 동량의 아세토니트릴을 넣어 전처리 하였다.

<174> 비교군 1로는 세프트리악손을 물에 녹여 40mg/kg 용량을 실시예 6과 같은 경로로 투여 하였다.

<175> 비교군 2로는 세프트리악손을 생리식염수에 녹여 20mg/kg 용량을 정맥주사 하였다.

<176> 도 7과 도 8에서 나타난 바와 같이, 실시예 6을 투여하였을 경우 정맥주사와 비교하였을 때 생체이용율이 22.8%이었고, 실시예 7을 투여하였을 경우 35.1%이었다. 반면 세프트리악손 수용액을 투여한 비교군 1의 경우 세프트리악손의 체내 흡수는 거의 없었고, 세프트리악손을 지질에만 봉입시켜 투여한 비교예 6의 경우 본 발명의 실시예 보다 최고 혈중농도도 낮았고, 생체

이용율도 약 12.4%에 불과하였다. 실시예 6, 7을 비교예 6과 비교하였을 때 보다 세프트리아손 혈중농도가 서서히 낮아짐을 알 수 있었고, 특히 세프트리아손을 정맥주사한 비교군 2에 비해 초기 약물 농도는 낮으면서 1.5시간 후에는 더 높은 약물농도가 유지되었다. 이로 보아 본 발명에 의한 조성물은 주사제보다 초기 고혈중 농도로 인한 세프트리아손의 부작용은 줄이면서 약효를 더 지속시킬 수 있는 것으로 판단되었다.

<177> 이상과 같이, 본 발명에 의한 조성물은 나노입자내 수용성 약물의 봉입효율이 우수하며, 체내에 존재하는 지질/단백효소에 대해 약물을 안정하게 보호하였고 위장관내 흡수도 매우 뛰어나 높은 혈중 약물 농도를 나타내었다.

【발명의 효과】

<178> 상술한 바와 같이, 본 발명의 경구투여용 나노입자 조성물은 수용성 약물의 입자내 봉입율이 우수하며 위장관내에서 효소에 의해 불안정한 약물을 안정하게 보호함은 물론, 위장관막으로의 흡수성이 뛰어나 수용성 약물의 전하에 의해 경구흡수가 제한되는 수용성 약물의 경구 생체 이용율을 높일 수 있는 약물전달시스템으로서 유용하게 이용할 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

전하를 띤 수용성 약물과 이와 반대 전하를 띤 물질이 결합된 수용성 약물-반대전하물질 복합체 0.1 ~ 30 중량%, 지질 0.5 ~ 80 중량%, 폴리머 0.5 ~ 80 중량%, 유화제 1 ~ 80 중량%, 용해보조제 0 ~ 90 중량%를 포함하고, 상기 지질과 폴리머의 중량비가 1:0.05~3이며, 입자 크기가 500 nm 이하인 나노입자를 함유하는 경구투여용 조성물.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 수용성 약물이 나노입자 조성물 내에 70% 이상 봉입되어 있는 경구투여용 조성물.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 수용성 약물이 판크레아틴 효소액 존재 하에 80% 이상 잔류하는 경구투여용 조성물.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 수용성 약물이 인슐린, 에리스로포이에틴, 칼시토닌, 성장호르몬, 인터페론 및 소마토스타틴으로 구성된 단백질/펩티드 약물 군으로부터 선택되는 경구투여용 조성물.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 수용성 약물이 헤파린, 세파게 항생제, 소듐 알렌드로네이트, 소듐 에티드로네이트 및 소듐 파미드로네이트로 구성되는 수중에서 전하를 띌 수 있는 약물군에서 선택되는 경구투여용 조성물.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 반대 전하물질이 $C_{8\sim 18}$ 지방산의 소듐염 화합물, 담즙산의 소듐염, 소듐 알지네이트, 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 카보머 및 이들의 조합으로 이루어진 음이온 화합물 군에서 선택되는 경구투여용 조성물.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서, 지방산의 소듐염 화합물이 소듐 올레이트, 소듐 라울릴 설페이트, 소듐 카프로에이트 및 소듐 라우레이트로부터 선택되는 경구투여용 조성물.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서, 반대전하물질이 카르니틴 염류, 벤잘코늄 클로라이드, 세트리미드 및 이들의 조합으로 이루어진 양이온 화합물 군에서 선택되는 경구투여용 조성물.

【청구항 9】

제 1 항에 있어서, 수용성 약물과 반대전하물질의 몰비가 1 : 0.1~20 인 경구투여용 조성물.

【청구항 10】

제 9 항에 있어서, 수용성 약물과 반대전하물질의 몰비가 1:3~10인 경구투여용 조성물.

【청구항 11】

제 1 항에 있어서, 상기 지질과 폴리머의 중량비가 1:0.2~1인 경구투여용 조성물.

【청구항 12】

제 1 항에 있어서, 지질은 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 프로필렌글리콜지방산에스테르(propylene glycol ester of fatty acid), 글리세롤지방산에스테르(Glycerol ester of fatty acid), 세토스테아릴 알코올, 세틸 알코올로 이루어지는 지방알코올류 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 경구투여용 조성물.

【청구항 13】

제 1 항에 있어서, 폴리머는 메타크릴산코폴리머, 히드록시프로필셀룰로오스프탈레이트 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트, 셀락, 키토산, 히드록시프로필메틸셀룰로오스 및 그 유도체, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 소듐 알지네이트, 카보머 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 경구투여용 조성물.

【청구항 14】

제 1 항에 있어서, 유화제는 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 공중합체, 폴리에틸렌 글리콜알킬에테르, 폴리옥시에틸렌캐스터오일, 폴리옥시에틸렌솔비탄지방산에스테르, 라브라필, 라브라솔, 플루롤올레이크, 비타민 E 폴리에틸렌글리콜 석시네이트, 레시틴, 소듐라우릴설페이트, 담즙산 및 그 유도체 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 경구투여용 조성물

【청구항 15】

제 1 항에 있어서 용해보조제는 C₁₋₈ 알코올, 디메틸설펍사이드, 디클로로메탄, 톨루엔, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 및 12-히드록시스테아레이트로 이루어진 군에서 선택되는 경구투여용 조성물.

【청구항 16】

제 1 항에 있어서, 0.1~30 중량%의 동결건조 보호제를 추가로 함유하는 경구투여용 조성물.

【청구항 17】

제 16항에 있어서, 동결건조보호제는 글루코오즈, 만니톨, 소르비톨, 트리할로오즈, 아미노산, 알부민 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 경구투여용 조성물.

【청구항 18】

제 1 항에 있어서, 나노입자의 입자 크기는 20~300nm인 경구투여용 조성물.

【청구항 19】

(a) 전하를 띤 수용성 약물을 반대 전하를 띤 물질과 이온결합시켜 수용성 약물-반대전하물질 복합체를 형성하는 단계;

(b) 얻어진 복합체에 지질, 폴리머 및 용해보조제를 넣어 용해시키는 단계;

(c) (b)에서 얻은 혼합물을 유화제 함유 수용액에 가하여 균질한 액상을 얻는 단계; 및

(d) (c) 에서 얻은 혼합물로부터 용해보조제를 제거하는 단계

를 포함하는 제 1항에 따른 경구투여용 나노입자 조성물의 제조방법.

【청구항 20】

제 19 항에 있어서, (e) 마이크로플루다이어저(microfluidizer)를 사용하여 입자 크기를 최소화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

【청구항 21】

제 19 항에 있어서, (a) 단계에서 수용성 약물에 전하를 부여하기 위해 수용성 약물을 pH 조절제로 처리하여 전하를 띤 수용성 약물이 얻어지는 방법.

【청구항 22】

제 21항에 있어서, pH 조절제가 염산, 인산, 탄산, 구연산, 수산화 나트륨, 인산일수소 나트륨/칼륨, 인산이수소 나트륨/칼륨, 인산 나트륨, 구연산 나트륨 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

【청구항 23】

(a) 전하를 띤 수용성 약물을 반대 전하를 띤 물질과 이온결합시켜 수용성 약물-반대전하물질 복합체를 형성하는 단계;

(b) 얻어진 복합체에 지질 및 용해보조제를 넣어 용해시키는 단계;

(c) (b)에서 얻은 혼합물을 폴리머 및 유화제 함유 수용액에 가하여 균질한 액상을 얻는 단계; 및

(d) (c) 에서 얻은 혼합물로부터 용해보조제를 제거하는 단계

를 포함하는 제 1항에 따른 경구투여용 나노입자 조성물의 제조방법.

【청구항 24】

제 23 항에 있어서, (e) 마이크로플루다이저를 사용하여 입자 크기를 최소화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

【청구항 25】

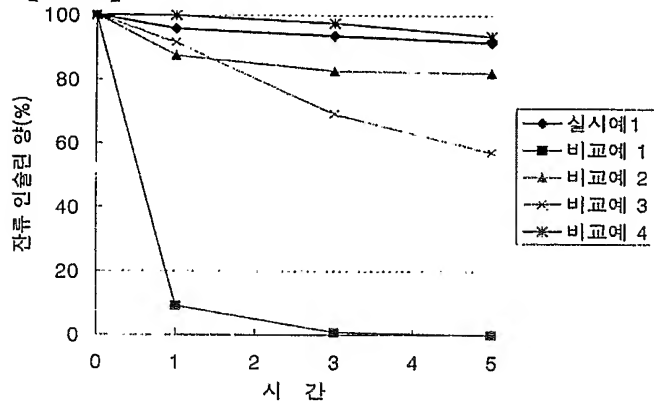
제 23 항에 있어서, (a) 단계에서 수용성 약물에 전하를 부여하기 위해 수용성 약물을 pH 조절제로 처리하여 전하를 띤 수용성 약물이 얻어지는 방법.

【청구항 26】

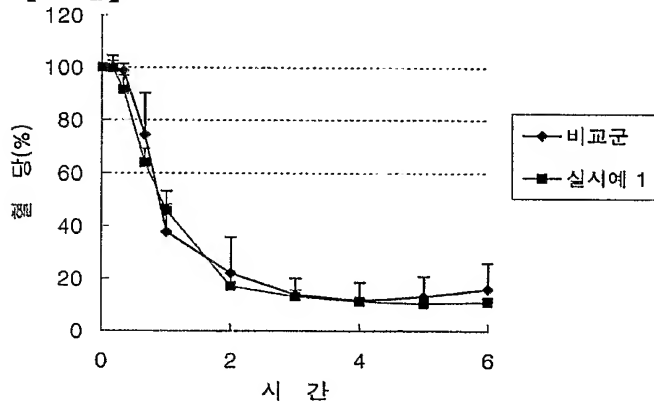
제 25항에 있어서, pH 조절제가 염산, 인산, 탄산, 구연산, 수산화 나트륨, 인산일수소 나트륨/칼륨, 인산이수소 나트륨/칼륨, 인산 나트륨, 구연산 나트륨 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

【도면】

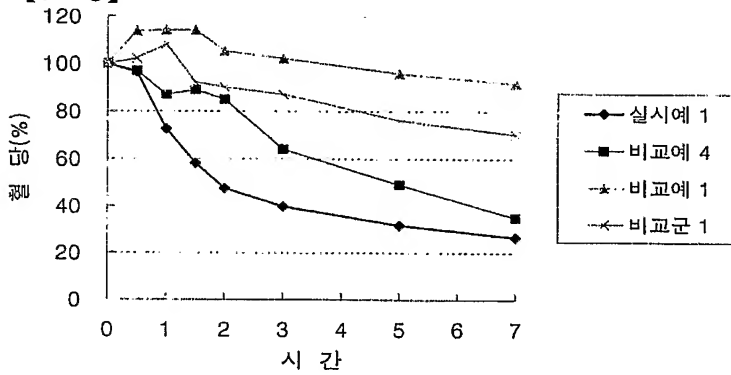
【도 1】



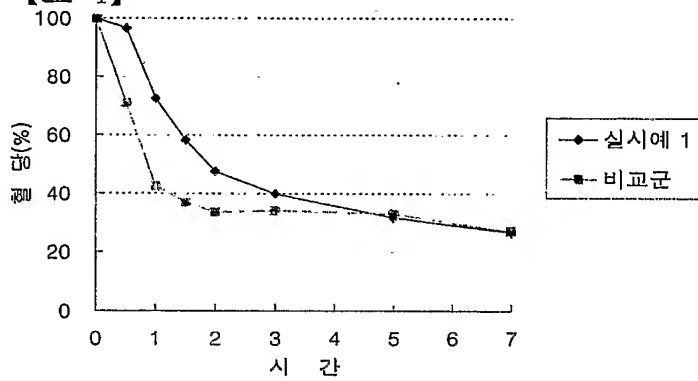
【도 2】



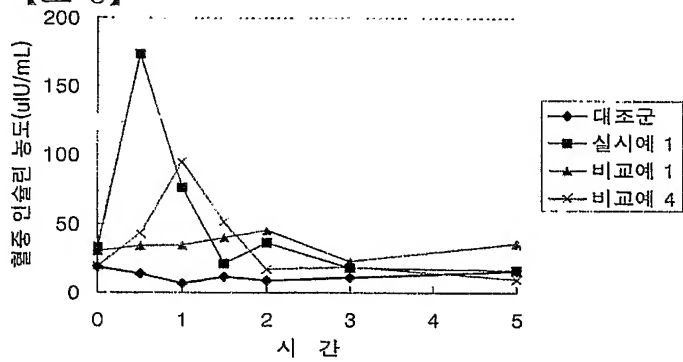
【도 3】



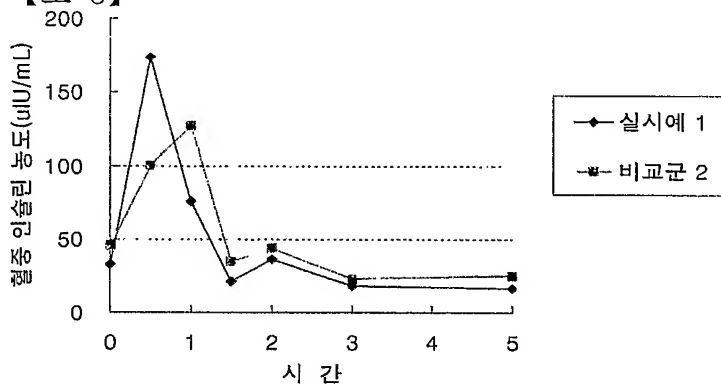
【도 4】



【도 5】



【도 6】



【도 7】

